

10/523098

DO Rec'd PCT/PTO 01 FEB 2005

JP H05-328986 A

PRODUCITON OF THEANINE

Abstract:

PURPOSE: To enable the high-yield, high-stability production of theanine which is useful as a food flavor, a palatable component of GYOKURO green tea in an industrial scale, by using the immobilized cell bodies of a microorganism capable of producing theanine in *Pseudomonas*.

CONSTITUTION: *Pseudomonas nitroreducens*-IFO 12694 is inoculated in the culture medium containing glucose, sodium glutamate, ethylamine hydrochloride, phosphate salts and so on and cultured aerobically at 30°C for 20hrs. then the cell bodies are collected by centrifugation. The cell bodies are immobilized to a high molecular material such as &Kgr;-carrageenan, polyacrylamide, agar or alginic acid by the inclusion method to prepare the immobilized cell bodies. A column is filled with the immobilized cell bodies and a 0.5 M borate buffer solution (pH 9.5) containing glutamine and ethylamine is circulated through the column for 22 days. Then, the reaction mixture is desalted, concentrated under reduced pressure and spray-dried to give the objective theanine stably in high yield.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-328986

(43)公開日 平成5年(1993)12月14日

(51)Int.Cl.⁵
C 12 P 17/10
// (C 12 P 17/10
C 12 R 1:38)

識別記号 庁内整理番号
8931-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1(全4頁)

(21)出願番号 特願平4-184318

(22)出願日 平成4年(1992)5月30日

(71)出願人 000204181

太陽化学株式会社

三重県四日市市赤堀新町9番5号

(72)発明者 大久保 勉

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化
学株式会社内

(72)発明者 V. H. アベリアン

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化
学株式会社内

(72)発明者 武藤 孝次

三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化
学株式会社内

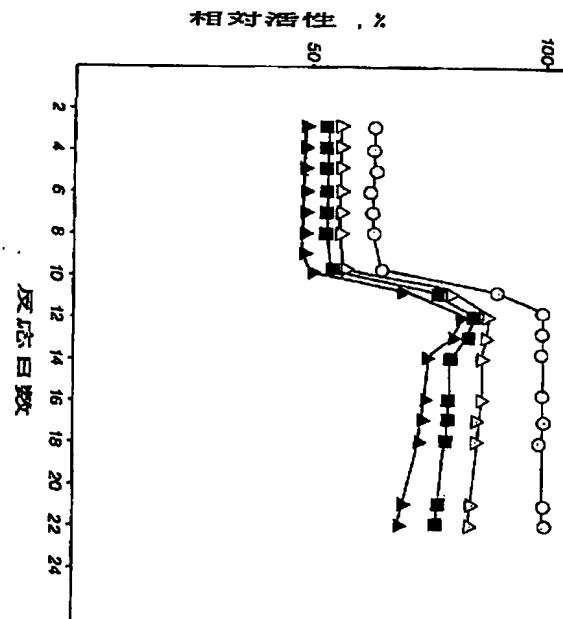
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 テアニンの製造方法

(57)【要約】

【目的】 本発明は細菌の固定化菌体を用い、テアニンを高収率・高安定的に製造する方法を提供することにある。

【構成】 固定化菌体を用いることを特徴とするテアニンの製造方法。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 固定化菌体を用いることを特徴とするテアニンの製造方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はテアニンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術・発明が解決しようとする課題】 テアニンは玉露の旨味成分として知られ、茶をはじめとする食品の香味および調味成分として重要でありその需要が高まりつつある。また一方では、テアニンを含めたアーチルタミル誘導体は、動・植物体における生理活性物質として作用することが知られている。

【0003】 例えば、Chem.Pharm.Bull., 19(7) 1301-1307(1971), 同19(6)1257-1261(1971), 同 34(7) 3053-3057(1986), 薬学雑誌 95(7) 892-895(1975), Agric.Biol.Chem., 51, 3281-3286(1987), 同 52, 3173-3174(1988) には、テアニンがカフェインの中核興奮作用を抑制する物質であると考えられ、その生理活性物質としての有用性が期待されている。

【0004】 従来より、テアニンの製造方法としては玉露などの茶葉から抽出する方法が一般的であるが、この場合、テアニンは茶葉乾燥物あたりわずか1.5%しか蓄積されず、また一般の茶園では光合成が活発であるためほとんど蓄積されないのが実状である。従って、茶葉からの抽出法では工業的に実用的でない。

【0005】 また他の製造方法としてテアニンを化学的に有機合成する方法が報告されている (Chem.Pharm.Bull., 19(7), 1301-1307(1971), Biosci.Biotech.Biochem., 56(4), 689(1992))。しかし、このような有機合成反応では収率が低く、生成物の分離精製等において煩雑な操作を必要とするという問題点が指摘されている。

【0006】 このようなことから、植物細胞もしくは微生物を利用した生合成法が報告されている。茶の細胞培養による方法 (特開平3-187388号) では、培養細胞の増殖率が極めて低いことが問題となっており実用的には難しい。また、特公昭63-28596号公報では酵母が糖の発酵の際に生成するATPを利用して、グルタミン合成酵素の存在下でグルタミン酸からテアニンを合成する方法が開示されている。しかしながら、この方法では酵母の至適pHが中性(8-6)であるのに対して、グルタミン合成酵素の反応至適pHが10-11であるために両反応を組み合わせることは容易ではなく、工業的規模での実施が困難であることが指摘されている。

【0007】 そこで、Pseudomonas 属細菌から得られるグルタミナーゼにグルタミンとエチルアミンをpH9-12の条件下で作用させることを特徴とするテアニンの製造方法を提案している (平成3年特許願第263120号)。しかし、この方法ではいくつかの問題点がある。

すなわち、酵素の精製が煩雑であること、pHおよび温度に対する酵素の安定性に問題があること、さらに反応後の酵素と生成物の分離操作が煩雑であること、および連続的な反応によるテアニンの生産が困難である等の多くの問題点を有する。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは前記の課題を解決すべく銳意研究を重ねた結果、Pseudomonas 属細菌の固定化菌体を用いることにより従来の方法に比べ操作が簡単で、かつテアニンが高収率・高安定的・連続的に得られることを見いだし、本発明を完成するに至った。

【0009】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明の固定化菌体に用いられる菌体はPseudomonas 属細菌、Saccharomyces 属等の酵母、Aspergillus 属等のかび等の菌体が用いられる。好ましくは、Pseudomonas 属細菌の菌体が好適であり、Pseudomonas 属細菌としては、Pseudomonas nitroreducens, Pseudomonas aptata, Pseudomonas denitrificans 等が挙げられる。これらの菌体を得るために通常の培養方法でよい。好ましくは、高いテアニン生成能を有する菌体を得るために培地中にグルタミン酸ナトリウムおよび塩酸エチルアミンを添加することが効果的である。

【0010】 本発明の固定化菌体とは、ある一定の空間に閉じ込められた状態にある微生物菌体であり、さらに連続的に酵素反応を行うことができ、反応後、微生物菌体を回収し、再利用できる状態にある微生物菌体のことであり、公知の定義と同様である。

【0011】 本発明に用いられる固定化菌体は、各種固定化担体に公知の方法に従って調製できる。菌体の固定化方法は無機担体、有機担体、陰イオンおよび陽イオン交換体に菌体を結合させる方法、グルタルアルデヒドのような試薬によって菌体と菌体を架橋する方法および高分子素材を用いて菌体を包括する方法のいずれでも良い。好ましくは、テアニンの高収率および固定化菌体の安定性等の観点からカラギーナン、ポリアクリルアミド、寒天およびアルギン酸を用いた包括法が好適に使用できる。

【0012】 以下、固定化菌体によるテアニン製造時の反応条件について説明する。用いた固定化菌体はカラギーナンを固定化担体とし、公知の方法により調製したものである。

(1) 反応pH

テアニン生成に対する本固定化菌体による反応のpHは30°C, 30分間の条件ではpH 7-10の範囲で安定であり、9.5が最適である。本反応に用いられる緩衝液は通常の緩衝液でよく、好ましくはホウ砂-水酸化ナトリウム緩衝液、炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液が好適に使用できる。その濃度は適宜選択できる。

50 【0013】 (2) 反応温度

テアニン生成に対する本反応の温度は pH 9.5, 30 分間の条件では 35°C まで安定であり、30°C が最適である。

【0014】(3) 基質濃度

基質として添加するグルタミンおよびエチルアミンの濃度には特に制限はなく、基質溶液の流速および反応温度等により適宜決定できる。すなわち反応後に未反応のグルタミンおよびエチルアミンが残存しないように決定すればよく、このことにより反応液からのテアニンの分離・精製が容易となる。

【0015】テアニン生成に対する至適グルタミン濃度は、エチルアミンを 0.7M で固定し、グルタミンの濃度を 0.05-0.7M の範囲まで変化させ、pH 9.5, 30 °C, 60 分間反応させた場合、グルタミン濃度が 0.3M 付近が最適であった。なお、テアニン生成におけるグルタミンに対する Km 値は約 0.025M である。

【0016】次に、至適エチルアミン濃度は、グルタミンを 0.3M で固定し、エチルアミン濃度を 0.3-1.0M の範囲まで変化させ、pH 9.5, 30 °C, 60 分間反応させた場合、0.75M 以上の濃度でテアニンの生成量が一定となった。この結果から、エチルアミン濃度は 0.7M 付近が最適である。

【0017】(4) 基質溶液の流速

κ -カラギーナンで固定化した菌体 200 ml をシャケット付きガラスカラム (1.7 × 40cm, 30°C) に充填し、0.3M グルタミンおよび 0.7M エチルアミンの基質溶液を流速 (SV) を 0.1-0.5 の範囲まで変化させ、最適流速を求めた。その結果、SV=0.3 からテアニン生成は一定となり、最適流速 SV は約 0.3 付近である。

【0018】このようにして得られる本反応液中には反応産物のテアニンとわずかな未反応の基質のみが含まれている。従って本反応液からのテアニンの分離・精製は、極めて簡単である。すなわち濃縮、膜による分離・濃縮、溶媒分配、透析および各種クロマトグラフィー、HPLC を組み合わせることにより容易に行うことができる。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

実施例 1. *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 の培養

1.0% グルコース、0.05% 酵母エキス、0.75% グルタミン酸ナトリウム、0.1% 塩酸エチルアミン、0.15% リン酸第二カリウム、0.15% リン酸第一カリウム、0.01% EDTA-F_e および 0.07% 硫酸マグネシウム 7 水和物を含む培養液 (pH 5.5) を用いて 30°C, 20 時間、好気培養を行い、遠心分離により菌体を得た。

【0020】実施例 2. 固定化菌体の調製 (1)

得られた *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 の菌体を κ -カラギーナンに固定化した。可溶化した 3.4% κ

-カラギーナン 450ml に、実施例 1 で得た菌体 80g を加えすればやく攪拌後、4 °C で 30 分間静置した。同量の 0.3M KCl を加え、4 °C、1 時間静置したゲルを適當な大きさ (約 \varnothing 2mm × 10mm) に細断した。このゲルに 0.3M KCl で可溶化した 1% ヘキサメチレンジアミン 500 ml を加え、4 °C、10 分間静置後、水洗した。さらに 0.5% グルタルアルデヒド 250 ml を加え 4 °C、10 分間静置後、水洗し本発明の固定化菌体を得た。固定化菌体 800 ml をシャケット付きガラスカラム (1.7 × 40cm, 1 本当りの容量 200 ml) 4 本に充填し 30°C に保温した。

【0021】実施例 3. 固定化菌体の調製 (2)

実施例 1 で得られた菌体をポリアクリルアミドに固定化した。ポリアクリルアミド 60g、N, N'-メチレンーピス (アクリルアミド) 3.2g を溶かした水溶液 275ml に菌体 60g、N, N, N', N' - テトラメチルエチレンジアミン 1.0g、亜硫酸アンモニウム 1.0g を順次添加後、10°C、30 分間冷却しゲルを得た。実施例 2 と同様に、このゲルを細断、ヘキサメチレンジアミン、グルタルアルデヒドにて処理し、本発明の固定化菌体を得た。

【0022】実施例 4. テアニンの連続製造

0.3M グルタミンおよび 0.7M エチルアミンの 0.05M ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) を調製し、実施例 2 で調製した固定化菌体を用いてテアニンの連続製造を行った。4 本のガラスカラムを第 1 のカラム、第 2 のカラム、第 3 のカラムおよび第 4 のカラムとつなぎ、SV = 0.3 の条件で 22 日間反応を行った。それぞれのカラムから出た反応液をサンプリングしテアニンの生成量を測定した。結果を図 1 に示した。図 1 の相対活性とは、最も高いテアニン生成量を示した 1 日目の値 (反応液 1 リットル当たり 285 mmol) を 100 とした活性である。また表中の記号は、第 1 カラム (▲)、第 2 カラム (■)、第 3 カラム (△) および第 4 カラム (○) の反応液である。

【0023】図 1 から明かなように、各カラムとも反応 1 日目以降テアニン生成量が一定となり、最後の第 4 カラムの反応液の場合、1 リットル当たり 280-285 mmol と高い値を示し、グルタミンからテアニンへの変換率は約 95% であった。また本固定化菌体によるテアニン生成活性は、反応開始から 2 日間全く安定であり、長期間にわたるテアニンの連続製造が可能となった。

【0024】実施例 5. テアニンの分離・精製 (1)

実施例 4 で得られた反応液 1 リットルを 200 ml まで減圧濃縮後、10°C、30 分間冷却した。それに 400 ml のイソブロピルアルコールを加え攪拌後、濾過を行い、風乾しテアニンの結晶 48g を得た。

【0025】実施例 6. テアニンの分離・精製 (2)

実施例 4 のようにして得られた反応液 5 リットルを市販の脱塩装置にて脱塩し、1 リットルまで減圧濃縮後、噴霧乾燥してテアニンの粉末 220 g を得た。

【0026】この結晶をアミノ酸アナライザーによる分析を行うと、標準物質と同じ挙動を示した。また、この

結晶を塩酸あるいはグルタミナーゼで加水分解を行うと、1:1の割合でグルタミン酸とエチルアミンを生じたことから、エチルアミンがグルタミン酸の γ 位に結合していたことが示される。また、加水分解で生じたグルタミン酸がL型であること、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GluDH)により確認された。図2はテアニンの結晶の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルであり、標準物質および本結晶とも同一のスペクトルが得られた。

【0027】 $^1\text{H-NMR}$ の分析条件および結果は次の通りである。溶媒(D_2O)、内部標準(Sodium 4,4-dimethyl-4-silapentanesulfonate)、 $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: 1.109 (1H, t, $J=7.15$ Hz, $\alpha\text{-CH}_3$)、2.129 (2H, dd, $J=6.05, 13.75$ Hz, 4-CH_2)、2.394 (2H, dd, $J=6.05, 13.75$ Hz, 3-CH_2)、*

10

* 3.200 (2H, dd, $J=7.15, 14.3$ Hz, $\alpha\text{-CH}_2$)、3.763 (1H, t, $J=6.05$ Hz, 2-CH)。これらの分析結果から得られた結晶がテアニンであることが示された。

【0028】

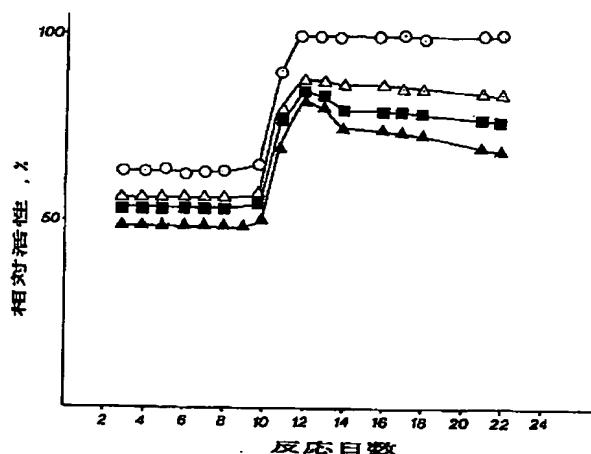
【発明の効果】本発明の製造方法により、テアニンが高収率、高安定かつ連続的に得られる。また、本発明の固定化菌体を得る方法、ならびにテアニンの分離・精製などの操作が極めて簡単であり、工業的規模での大量製造に貢献すること大である。

【図面の簡単な説明】

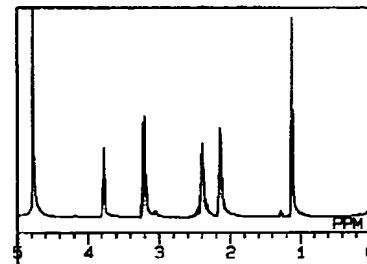
【図1】テアニンの生成量を示したものである。

【図2】テアニンの結晶の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 朱 政治
三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化
学株式会社内

(72)発明者 山本 武彦
三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化
学株式会社内
(72)発明者 金 武祐
三重県四日市市赤堀新町9番5号 太陽化
学株式会社内